

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19358

研究課題名(和文) 宿主と“共生的”なウイルス伝播機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of simbiotic viral infection mechanism

研究代表者

浦山 俊一 (URAYAMA, Syunichi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50736220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糸状菌に持続感染しているRNAウイルスがどのような方法で糸状菌間を伝播しているのが明らかにするため、細胞外膜小胞と呼ばれる細胞から放出される膜小胞が運び屋として機能している可能性の検証を目指した。解析の結果、イネいもち病菌が多量の細胞外膜小胞を産生する条件を見出し、その精製画分にはイネいもち病菌に持続感染しているRNAウイルスに由来するRNAが存在することを明らかにした。これまで持続感染型RNAウイルスと細胞外膜小胞の関係性は明らかにされておらず、当該知見は糸状菌のウイルスだけでなく、自然界にあまねく存在する持続感染型RNAウイルスの伝播機構理解に資するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスは宿主生物に病気を引き起こし、新たな宿主生物へと感染を広げていくものと理解されている。しかし、近年になって自然界の多くの生物には、明確な病徴を引き起こさないRNAウイルスが持続感染していることが明らかにされ始めている。本研究は、このような持続感染型のRNAウイルスが宿主生物を害することなく、感染を広げていく機構の解明を目指した。細胞外膜小胞と呼ばれる細胞が放出する膜小胞に焦点を絞った解析を行い、そこには持続感染型RNAウイルスの遺伝子が存在することを明らかにした。細胞外膜小胞を介した感染は確認できなかったが、この知見はRNAウイルスの伝播に寄与する新たな機構の存在を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To clarify how RNA viruses, that are persistently infected with filamentous fungi, are transmitted between fungal hosts, we focused on membrane vesicles released from cells called “extracellular membrane vesicles” as a vector. We found the conditions which rice blast fungus produces a large amount of extracellular membrane vesicles, and revealed that the purified extracellular membrane vesicle fraction contains RNAs derived from RNA virus that is persistently infected with rice blast fungus. Since the relationship between persistently infected RNA viruses and extracellular membrane vesicles has never been reported, this finding will contribute not only for understanding fungal virus transmission, but also for understanding the mechanism of transmission of persistently infected RNA viruses that are ubiquitous in nature.

研究分野：ウイルス生態学

キーワード：メンブレンベシクル 糸状菌 細胞外膜小胞 RNAウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスが初めて発見された 1898 年以来、ウイルスは病原因子として研究が進められてきた。一方、2005 年頃に次世代シーケンサーが登場したことにより、病徴に依存しない網羅的なウイルス探索が始まり、一見して健全に見える身近な生物にも多くのウイルス(主に RNA ウイルス)が潜んでいることが分かってきた

(2) 病原性ウイルスは宿主細胞を破壊して増殖するが、宿主と共存状態にあるウイルス(以下、共存型ウイルス)は、宿主と共存しつつも自らの生存の場を広げる独自の生存戦略を持つことが明らかになりつつある。例えば、あるウイルスは耐熱性や毒素産生能などポジティブな機能を宿主に付与し、宿主の環境に対する適応力を向上させることで、自らの生存の場を維持している。このように共存型ウイルスの機能の理解が進みつつある一方、共存型ウイルスがどのように伝播するかはほとんど明らかになっていない(図 1 上段)。

(3) 従来、共存型ウイルスは宿主の細胞分裂に伴って親細胞から娘細胞へ垂直伝播し、水平伝播はしないと考えられていた。しかし、異なる生物種から近縁のウイルスが検出される事例や、野外で水平感染を検出した(稀な例、メカニズムは不明)とする事例から、水平伝播経路の存在が示唆されはじめていた。自身も、これまで独自の共存型 RNA ウイルス網羅検出手法で海洋環境では共存型 RNA ウイルスが優占し、その中にはなぜか陸上の植物や糸状菌と近縁なウイルスが多く存在することを明らかにした。さらに、細胞内にしか存在しないはずの共存型ウイルスが液体培地上清中に出現する現象も世界で初めて見出し、共存型ウイルスが水平伝播する可能性は高いと考えている。

(4) 共存型ウイルスはどのように水平伝播しているのか? 本研究では宿主にダメージを与えずに広く生物間を移動可能であるということから“細胞外ベシクル小胞”が関わっているのではないかと予想した。細胞外ベシクル小胞はほとんどの細胞で分泌される直径 50~150nm 程度の膜小胞で、離れた細胞間の情報伝達に重要な役割を担う(図 1 下段)。共存型ウイルスと類似した性質を持つプラスミドが細胞外ベシクル小胞を介して伝播すること、DNA ウイルス由来の RNA が細胞外ベシクル小胞中に濃縮される現象はこの仮説を支持している。



図 1 : 本研究の背景

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでその存在が示唆されながらもその実態をつかめていなかった『細胞外ベシクル小胞を介した共存型ウイルスの水平伝播機構』が存在しているのかを明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルスゲノム含有細胞外ベシクル小胞の探索

共存型 RNA ウイルスを含む細胞外ベシクル小胞を取得するため、パン酵母およびイネいもち病菌を対象に細胞外ベシクル小胞が多量に取得可能な条件を探索する。培地や培養条件を変えて真菌を培養し、得られた培養上清中に細胞外ベシクル小胞がどの程度存在するのか測定する。具体的には、培養上清を 0.22 μm 孔のフィルターでろ過し、超遠心によりろ液中の細胞外ベシクル小胞を濃縮する。得られた沈殿画分中の脂質量を測定することで、細胞外ベシクル小胞量を推定する。

上記細胞外ベシクル小胞量の推定では検出されたシグナルが小胞構造を有しているかは明らかでなく、可能性のある条件を検討するためのものである。そこで、細胞外ベシクル小胞量が多いと推定された試料を用いて細胞外ベシクル小胞を密度勾配遠心法によって精製し、電子顕微鏡観察により当該画分に小胞構造を確認する。

精製した細胞外ベシクル小胞画分中に共存型 RNA ウイルスが存在するのか調べるため、RNA シーケンシング解析を行う。

### (2) ウイルス含有細胞外ベシクル小胞画分を用いた感染実験

精製した細胞外ベシクル小胞画分を受け手細胞に接触させ、ウイルスを受け取った細胞を検出する。

### (3) 野外のウイルス含有細胞外ベシクル小胞の探索

水圏環境より天然に存在する細胞外ベシクル小胞を精製し、RNA シーケンシング解析により当該画分にどの程度の RNA ウイルスが存在するのかを調査する。

## 4. 研究成果

### (1) パン酵母を用いたウイルスゲノム含有細胞外ベシクル小胞の探索

パン酵母は既に細胞外ベシクル小胞研究のモデル生物としても利用されており、細胞外ベシクル小胞の産生条件も報告されていた。また、本研究で使用するパン酵母株には共存型 RNA ウイルスの存在も確認しており、順調な進捗が見込まれていた。しかし、文献情報に基づいて産生させても、微量の細胞外ベシクル小胞しか得られず、感染実験に使用する十分量が得られないと判断した。

### (2) イネいもち病菌を用いたウイルスゲノム含有細胞外ベシクル小胞の探索

研究開始当初、糸状菌の細胞外ベシクル小胞研究はほとんど報告されておらず、培地や培養条件を変えることで細胞外ベシクル小胞が多量に取得可能な条件を探索した。結果、特定の培地を用いることで十分量の細胞外ベシクル小胞が得られることが分かった(図2)。当該試料より密度勾配遠心法により細胞外ベシクル小胞を精製し、電子顕微鏡観により多数の小胞様構造が存在することを確認した。イネいもち病菌に由来する細胞外ベシクル小胞は未だ報告されておらず、本結果は初めてイネいもち病菌が多量の細胞外ベシクル小胞を産生することを示したものと云える。

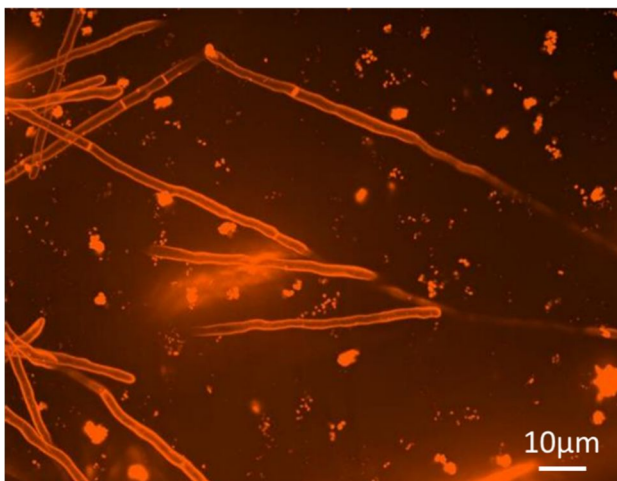


図2：イネいもち病菌液体培養時の脂質蛍光画像

### (3) イネいもち病菌由来の精製細胞外ベシクル小胞画分に含まれる RNA の調査

精製細胞外ベシクル小胞画分より取得した RNA を解析した結果、イネいもち病菌に持続感染している共存型 RNA ウイルスの配列が検出された。中でも、ウイルス粒子を有さないと考えられているタイプの RNA ウイルス配列が検出されたことから、少なくとも当該ウイルスについては細胞外ベシクル小胞に含まれるまたは接着していることが推定された。共存型 RNA ウイルスと細胞外ベシクル小胞の関連を示唆する結果は我々の知る限りなく、本研究がその可能性を示す初のデータと言える。一方、その他のウイルス配列については、細胞外ベシクル小胞画分とウイルス粒子の浮遊密度に大きな差がなく、当該画分にウイルス粒子が含まれている可能性を排除できなかった。

### (4) ウイルス含有細胞外ベシクル小胞画分を用いた感染実験

イネいもち病菌より取得した精製細胞外ベシクル小胞画分を、共存型 RNA ウイルスを除去した同質遺伝系統に滴下し、そこから複数株を分離したが、共存型 RNA ウイルス取得株は得られなかった。本研究では当初、当該実験はパン酵母を用いて行うことを想定していた。これは、細胞外ベシクル小胞を介したウイルス導入の効率は高くないと予想されたため、共存型 RNA ウイルス取得株をセレクションする必要があると考えたためである。パン酵母に持続感染している共存型ウイルスの中には毒素タンパク質の遺伝子を有しているものがあり、それを用いたセレクションを想定していた。しかし、上記理由によりパン酵母の系が利用できず、共存型 RNA ウイルスの伝播を高感度に検出することはできなかった。

本研究の実施期間中にはヒト病原性ウイルスと、原虫ウイルスにおいて細胞外ベシクル小胞に相当するものが感染に寄与している可能性を示唆する論文が発表された。

### (5) 野外のウイルス含有細胞外ベシクル小胞の探索

水圏試料より取得した細胞外ベシクル小胞画分を DNA シーケンシング解析に供したデータが取得済みであったためその評価を行ったところ、多量の DNA ウイルス配列が含まれていた。この結果から、当該細胞外ベシクル小胞画分にはウイルス粒子が多数含まれていることが示唆されたため、RNA シーケンシング解析を行っても十分な成果が見込めないと考え、実施を見送った。

### (6) 糸状菌由来の細胞外ベシクル小胞

本研究は共存型 RNA ウイルスと細胞外ベシクル小胞の関係を明らかにすることを目指したもの

であったが、その過程で行ったプロテオーム解析の結果、イネいもち病菌由来細胞外ベシクル小胞には分泌酵素と予想されるタンパク質も含まれることが明らかとなった。糸状菌は発酵や物質生産に広く利用されている生物であり、これには糸状菌が有する高いタンパク質分泌能が寄与している。そのため、糸状菌のタンパク質分泌については重点的な研究が行われているが、当時はタンパク質分泌と細胞外ベシクル小胞の関係を示す報告はなかった（本研究の終了年度後半に、糸状菌の分泌酵素が細胞外ベシクル小胞に含まれているという報告が1つ発表された）。そこで、様々な糸状菌を用いて細胞外ベシクル小胞の産生能を調査したところ、複数の発酵菌でその産生が確認された一方、調査した限りの条件では産生が確認されない菌株も複数存在した。得られた細胞外ベシクル小胞にどのようなタンパク質が含まれているのか今後調査したい。

#### (6) まとめ

本研究において、共存型ウイルスが細胞外ベシクル小胞を介して水平伝播しているという機構が明らかとなれば、ウイルスが生物種間を超えて幅広く行き来をしているという、従来はなかった全く新しいウイルスの世界を明らかにできると期待された。また、動物の共存型ウイルスでありながらヒトに感染することで甚大な被害をもたらすエボラやサーズといった新興感染症ウイルスが野外で維持されるメカニズム等を考える上でも画期的な情報が提供できるということも期待された。

研究の結果、一部の共存型ウイルスが細胞外ベシクル小胞と挙動を共にしている可能性を示唆する結果を得たが、水平伝播そのものを検出することはできなかった。この検出には感染細胞を選択する何らかの系が必要と考えられる。

これを達成するうえでも、糸状菌における細胞外ベシクル小胞の基礎的な情報を集めることは重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩橋由佳、浦山俊一、榎尾俊介、兼松周作、高谷直樹、野村暢彦、竹下典男、豊福雅典、萩原大祐
2. 発表標題 Aspergillus 属菌における細胞外膜小胞の探索
3. 学会等名 糸状菌分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦山俊一、岩橋由佳、榎尾俊介、兼松周作、森山裕充、高谷直樹、野村暢彦、竹下典男、豊福雅典、萩原大祐
2. 発表標題 イネいもち病菌における細胞外膜小胞の探索と性状解析
3. 学会等名 糸状菌分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syun-ich Urayama, Yuka Iwahashi, Shunsuke Masuo, Shusaku Kanematsu, Hiromitsu Moriyama, Naoki Takaya, Nobuhiko Nomura, Norio Takeshita, Masanori Toyofuku, Daisuke Hagiwara
2. 発表標題 Characterization of extracellular membrane vesicle in liquid culture of Magnaporthe oryzae and Aspergillus oryzae.
3. 学会等名 European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩橋由佳、浦山俊一、榎尾俊介、兼松周作、高谷直樹、野村暢彦、竹下典男、豊福雅典、萩原大祐
2. 発表標題 産業利用菌における細胞外膜小胞の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	豊福 雅典  (TOYOFUKU Masanori)  (30644827)	筑波大学・生命環境系・准教授    (12102)	